

Genetically Modified Animals



*Aprea Francesca
Arcarisi Lucia
Armenia Gabriella
Capotorti Eugenio
Carapezza Cecilia
Di Ciolo Caterina*

Cosa sono gli animali transgenici?



Animali il cui corredo genetico è stato modificato attraverso una **manipolazione del DNA**:

- **Transgenesi**: inserimento di uno o più geni
- **Knock-out genico**: inattivazione di un gene normalmente presente

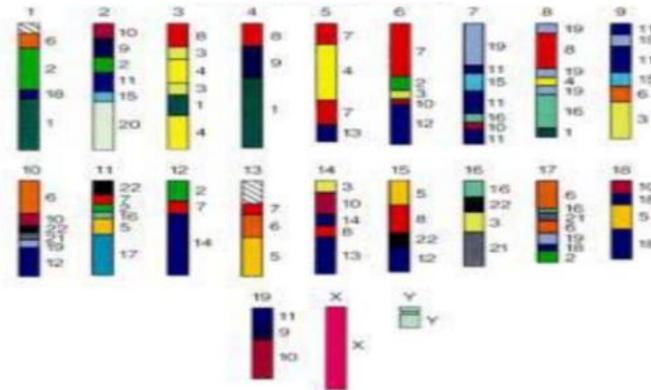


Animali utilizzati

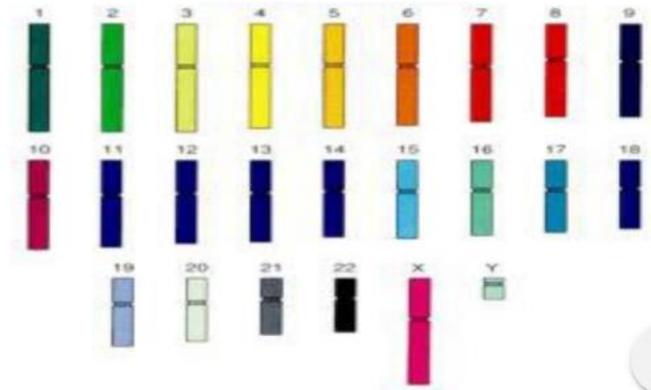


Topo: 99% dei geni murini ha un gene omologo nell'uomo, è un puzzle del genoma umano. Non comporta rischi di zoonosi.

Cromosomi di topo



Cromosomi umani



Zebrafish: è trasparente → Studi di malattie ematopoietiche ha uno sviluppo embrionale rapido

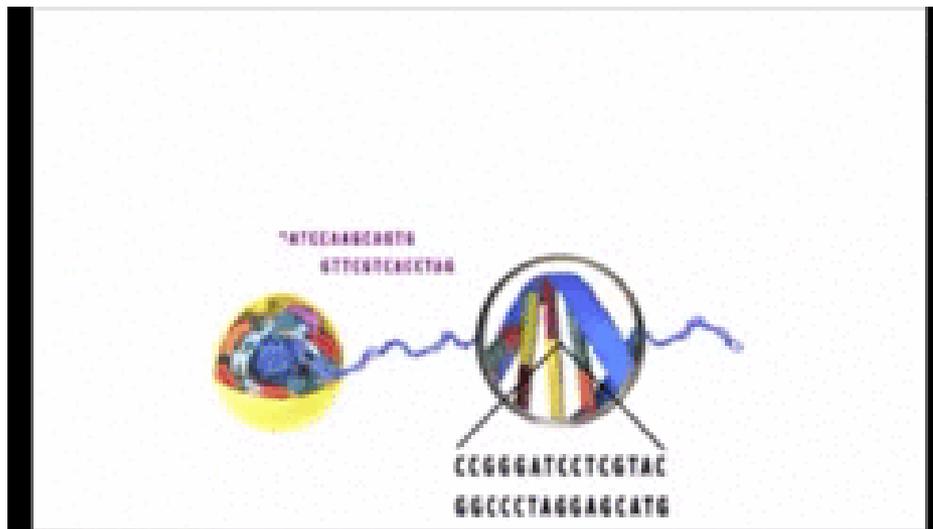
Suino: molto usato per gli xenotrapianti



Metodi Utilizzati



- ***Microiniezione*** nel pronucleo maschile
- ***Gene targeting*** con ricombinazione omologa in cellule staminali embrionali
- Trasferimento nucleare e ***clonazione***
- ***Genome editing***



1. Microiniezione



1

- Preparazione degli **oociti fecondati**

2

- Preparazione dei **costrutti**

3

- **Microiniezione** e trasferimento nelle femmine pseudogravide

4

- **Screening** della progenie



1. Microiniezione



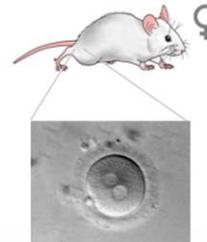
1

- Preparazione degli oociti fecondati

Accoppiamento



Raccolta degli oociti fecondati



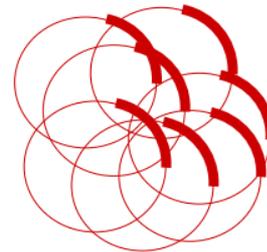
2

- Preparazione dei costrutti

Costruzione del transgene



Amplificazione del transgene

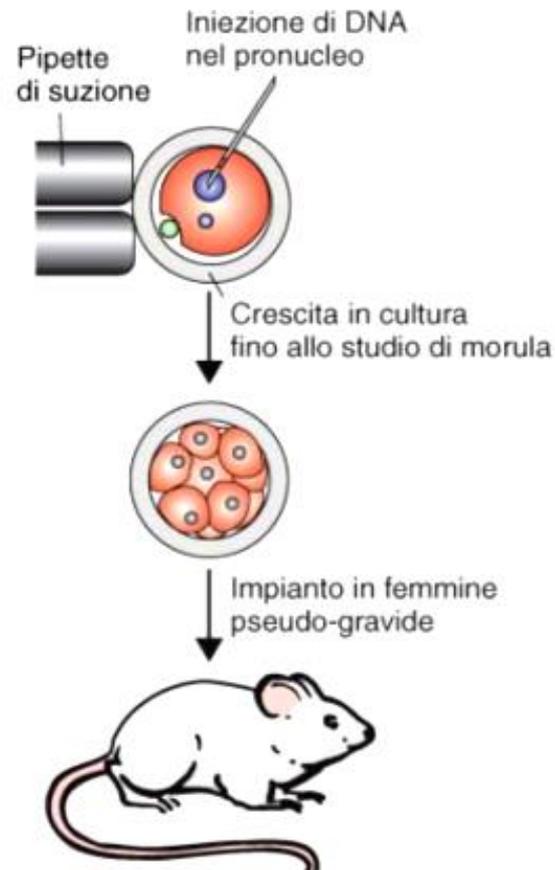


1. Microiniezione



3

- Microiniezione e trasferimento nelle femmine pseudogravide

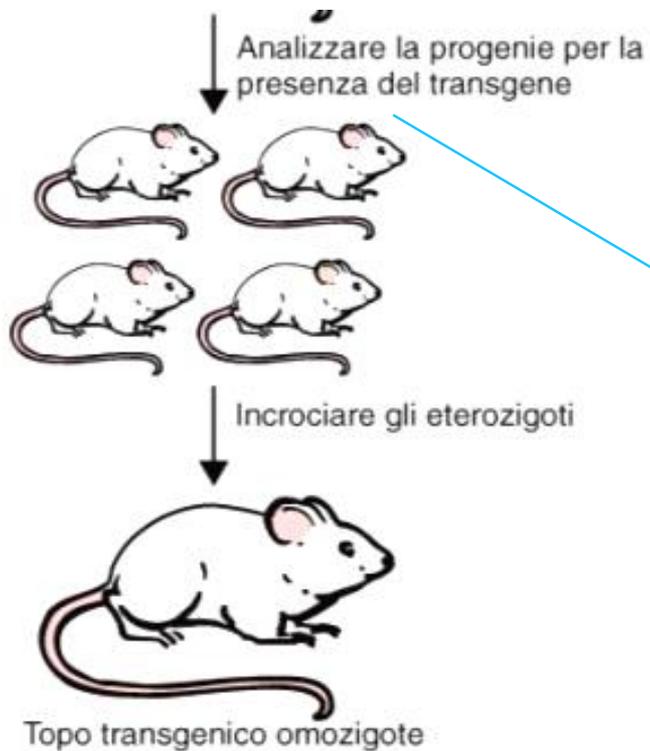


1. Microiniezione



4

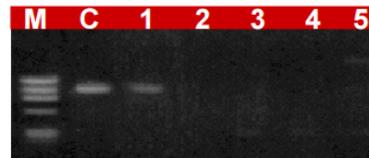
- Screening della progenie



Estrazione DNA dalle code della progenie



Analisi tramite PCR



Analisi tramite Southern-blot



1. Microiniezione



Vantaggi:

- Il DNA esogeno non deve necessariamente essere clonato in un vettore.
- I frammenti di DNA contenenti il gene di interesse andranno ad integrarsi nel genoma dell'animale in copie multiple in modo casuale.

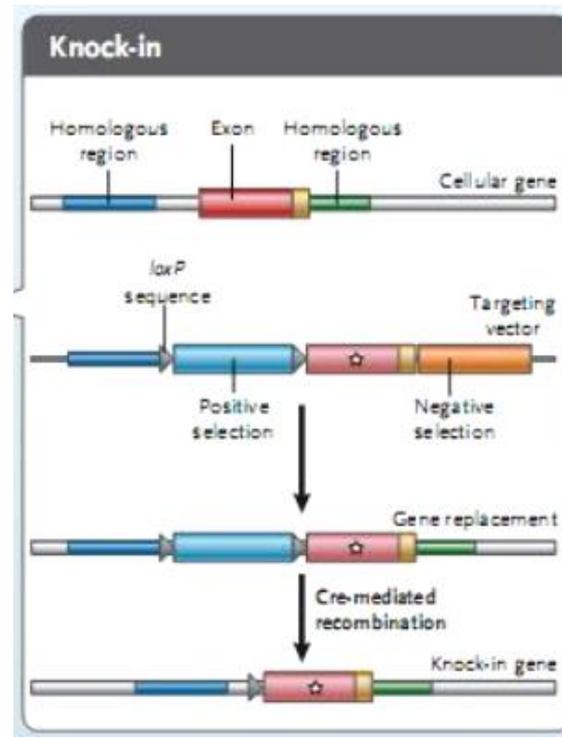
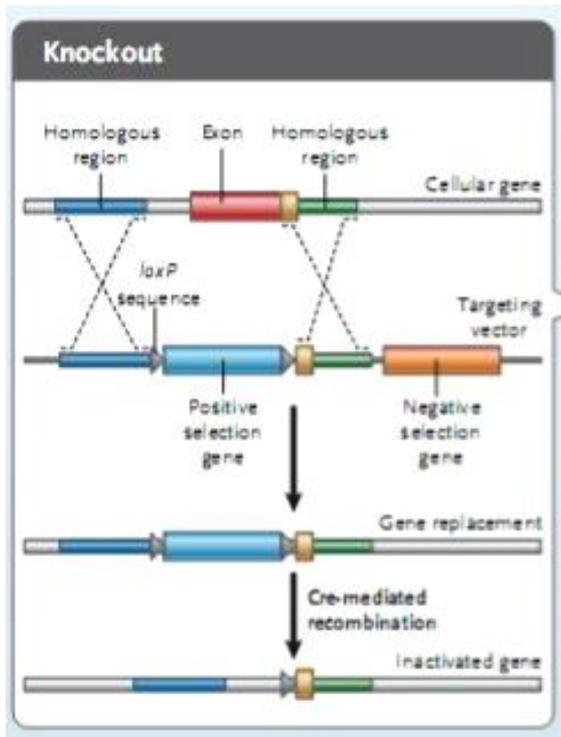
Svantaggi:

- L'integrazione random non è controllabile e non sostituisce geni malati esistenti.
- L'iniezione nel pronucleo può generare animali "mosaico" e l'espressione genica può essere limitata solo a determinati tessuti o organi.
- Bassa efficienza.

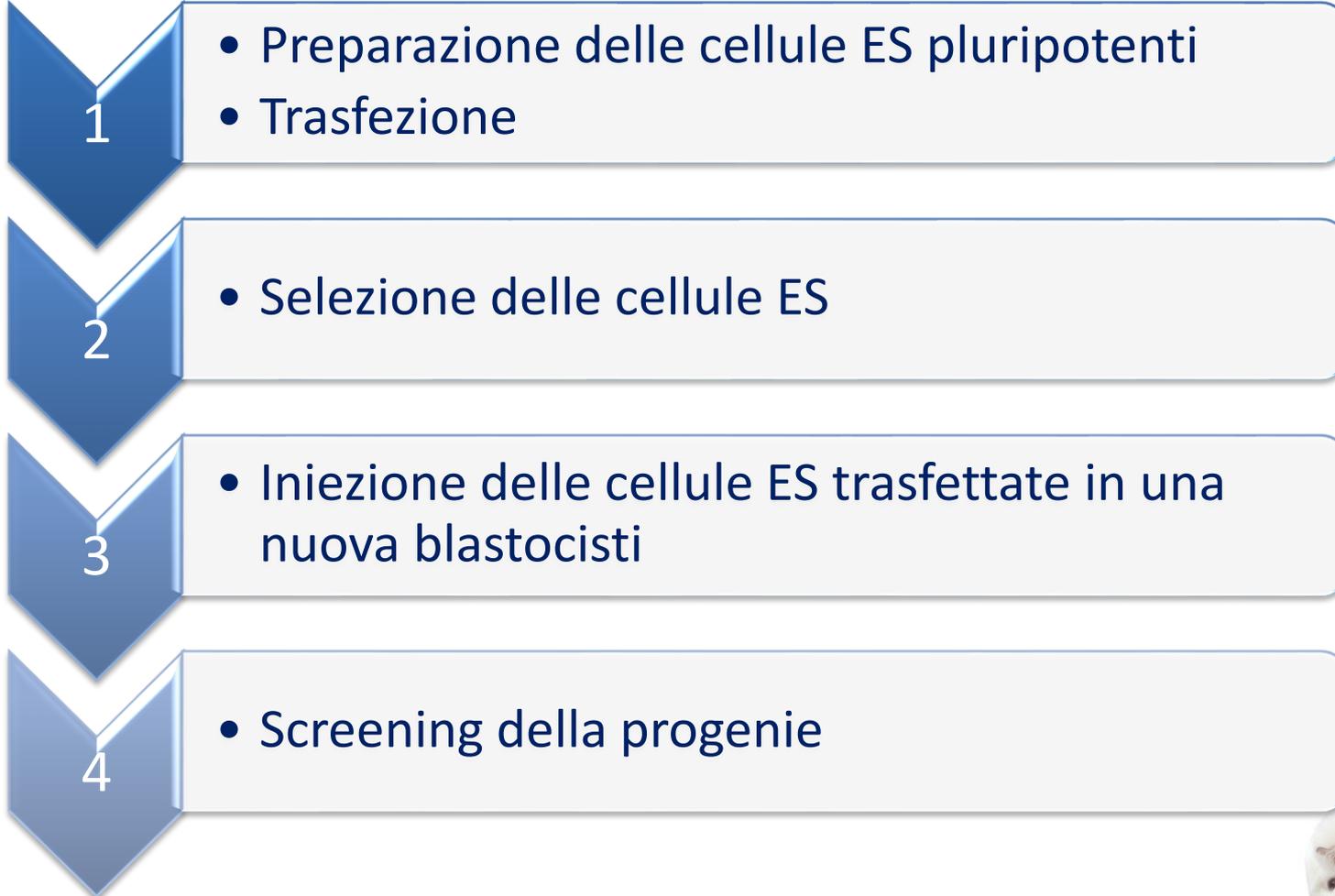


2. Gene Targeting

1. **Knock out:** Inattivazione dell'espressione di un gene
2. **Knock down:** Diminuzione dell'espressione di un gene
3. **Knock in:** Inserzione di un gene difettivo



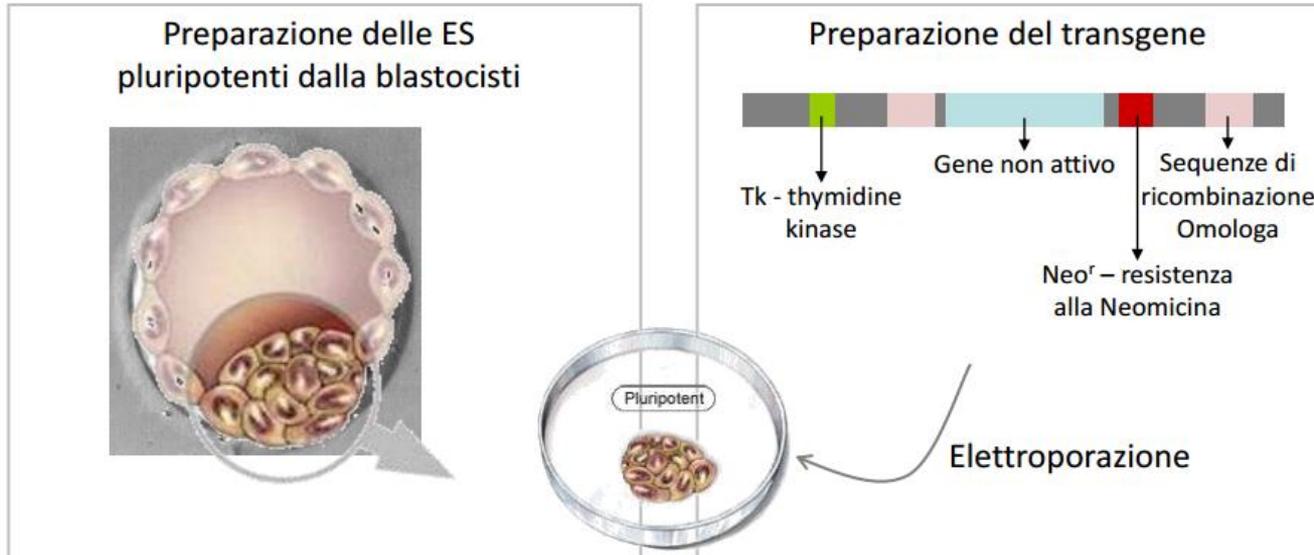
2. Gene Targeting



2. Gene Targeting



- 1 •Preparazione delle cellule ES pluripotenti
•Trasfezione
- 2 •Selezione delle cellule ES



2. Gene Targeting



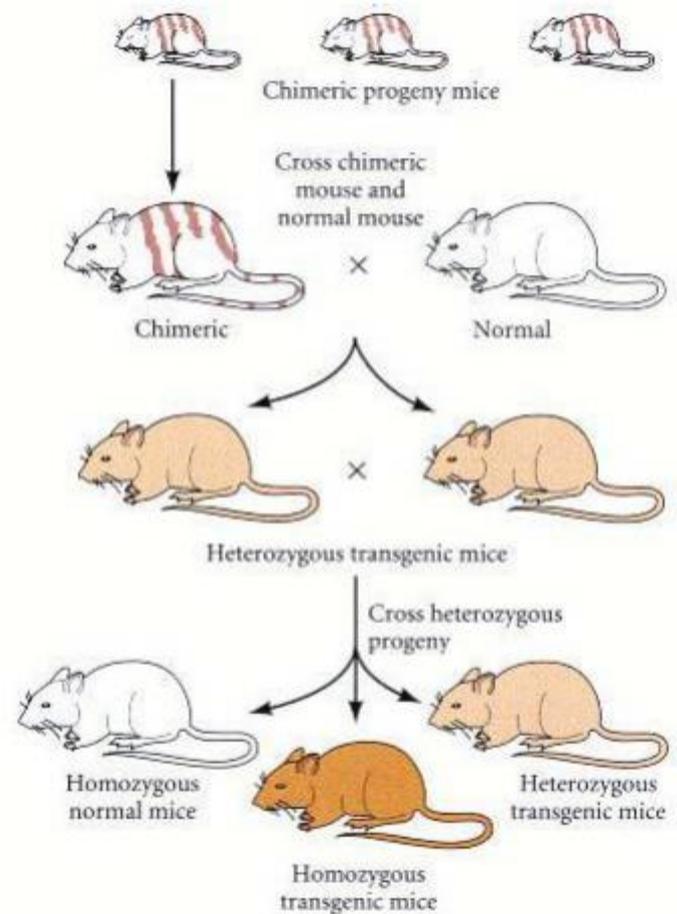
3 • Iniezione delle cellule ES trasfettate in una nuova blastocisti



2. Gene Targeting



4 • Screening della progenie



2. Gene Targeting



Vantaggi:

- L'inserzione del transgene avviene in maniera mirata
- Sfruttabile per gli studi di malattie geniche specifiche

Svantaggi:

- Metodo molto laborioso che richiede molto tempo
- Alta mortalità progenie omozigote



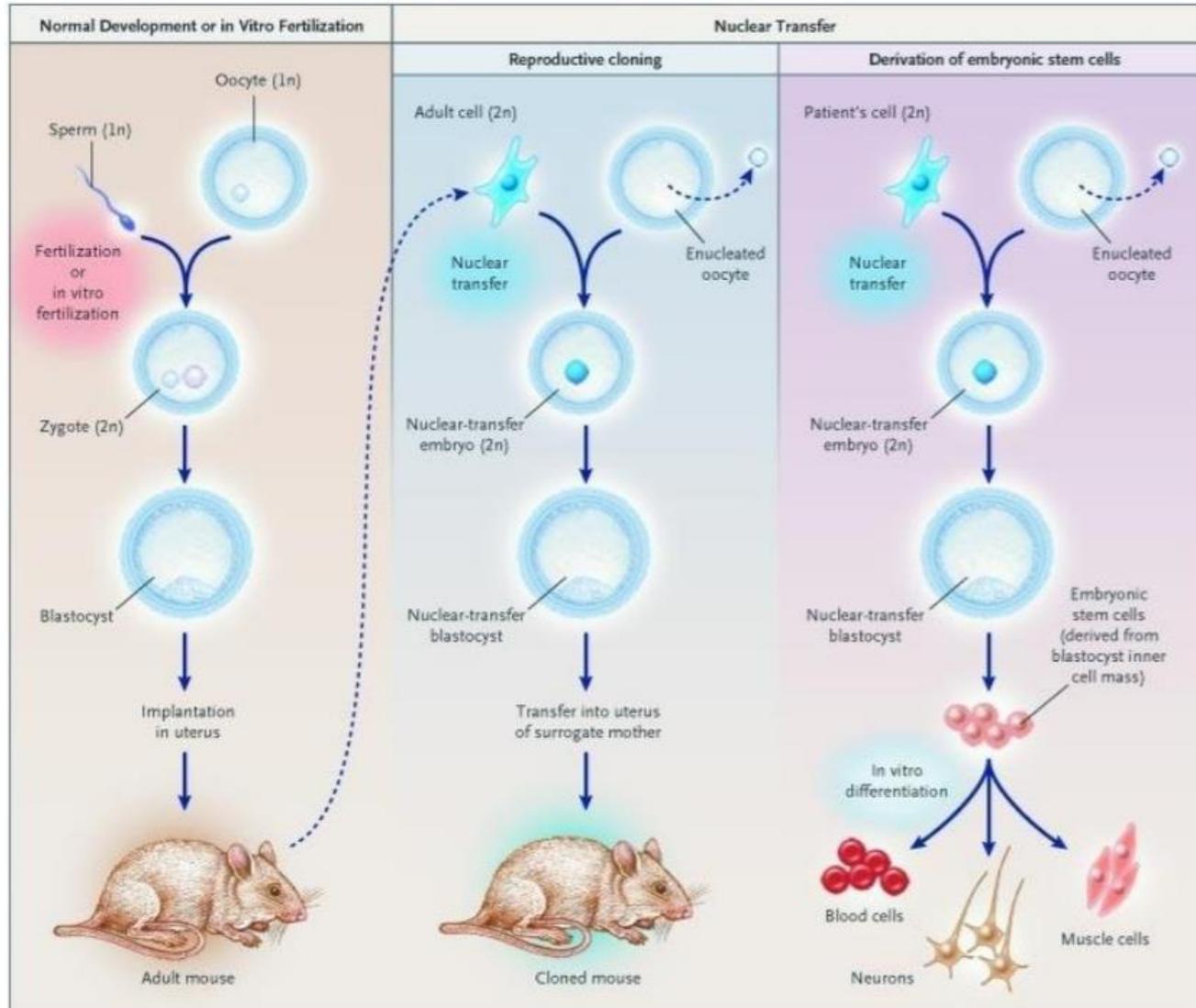
3. Trasferimento Nucleare



I Cloni vengono ottenuti attraverso **Somatic Cell Nuclear Transfer**



3. Trasferimento Nucleare



3. Trasferimento Nucleare



Vantaggi:

- Creazione potenziale di progenie in vitro
- Utile per xenotrapianto
- Produzione di grosse quantità di proteine ricombinanti
- Conservazione di animali in via di estinzione

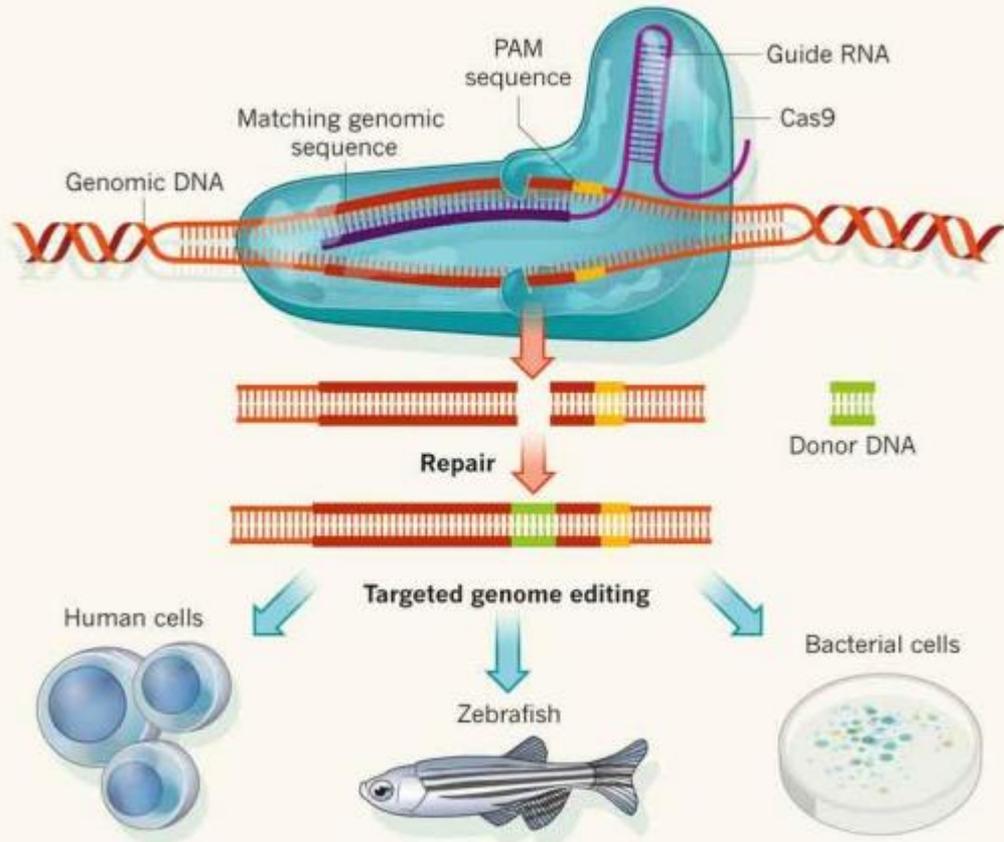
Svantaggi:

- Bassa efficienza
- Presenza di anomalie negli animali
- Alterazione della metilazione del DNA
- La cellula tende a rompersi con facilità perciò evitare pipette o aghi

Alternativa: sciogliere la membrana cellulare tramite saponi e, tramite campo elettrico fare uscire il nucleo dalla cellula e, sempre applicando un campo elettrico, inserire il nucleo dell'adulto.



4. Genome Editing



CRISPR/Cas:
“forbici del codice genetico”



4. Genome Editing



Vantaggi:

- Veloce rispetto alla ricombinazione omologa delle ES: agisce direttamente sullo zigote
- Non comporta costi eccessivi.

Svantaggi:

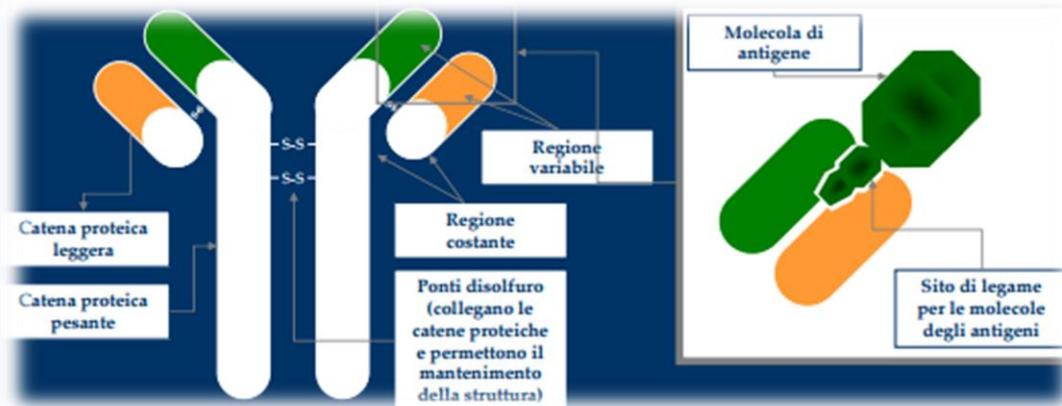
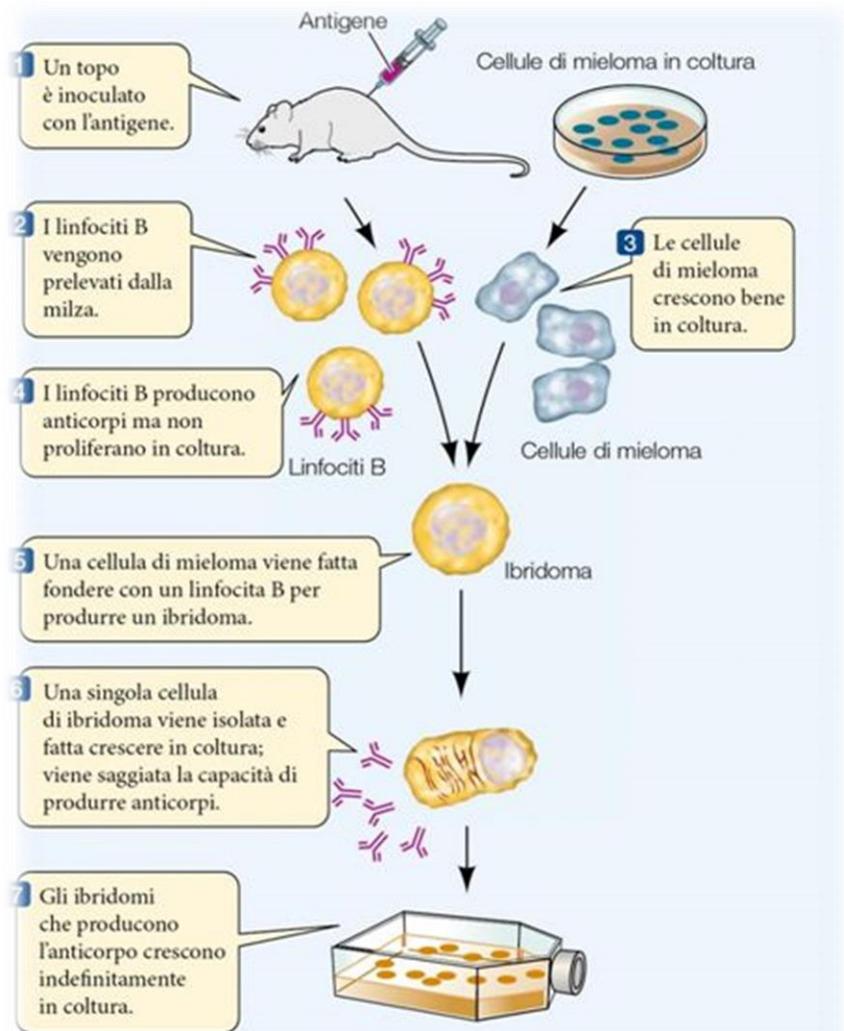
- Limitata alle sequenze riconosciute dalle nucleasi
- Comporta il rischio di off-targeting: intaccare, in modo imprevedibile e indesiderato, altre zone del genoma



1. Anticorpi Monoclonali



Anticorpi che reagiscono ad un solo antigene, che vengono creati tramite l'utilizzo di cavie murine



1. Anticorpi Monoclonali



Applicazioni diagnostiche e terapeutiche

- Immunosoppressori
- Antineoplastici
- Inibitori dell'angiogenesi

Trattamento specifico per:

- artrite reumatoide
- morbo di Crohn
- alcune neoplasie (in particolare del sistema emolinfopoietico)
- prevenzione della necrosi ischemica del miocardio secondaria a trombosi coronarica.

Limiti:

- induzione di una risposta immunitaria
 - emivita relativamente breve quando sono somministrati all'uomo
- Perciò si rendono chimerici o umanizzati.

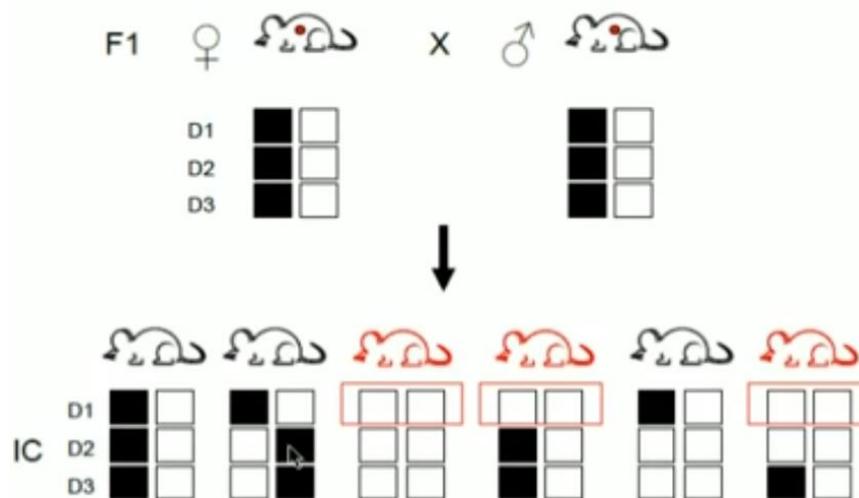


2. Modelli di Patologie



Avrai la malattia?

gene → **Malattia** si



2. Modelli di Patologie: Alzheimer



Gene codificante per APP
su **cromosoma 21**

Sono state
riscontrate
mutazioni
a carico di:

Gene codificante per
Presenilina 1 (PS1)

Gene codificante per
Presenilina 2 (PS2)



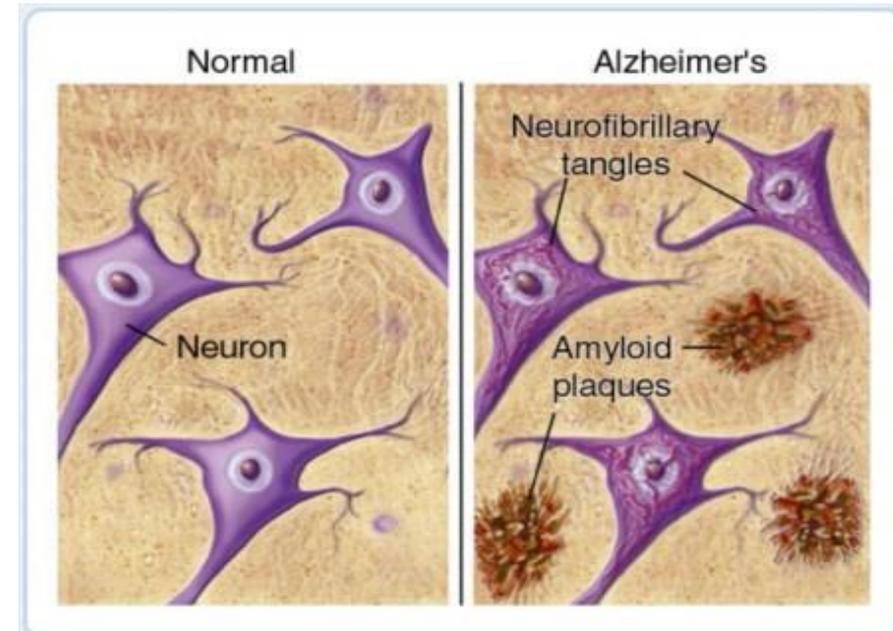
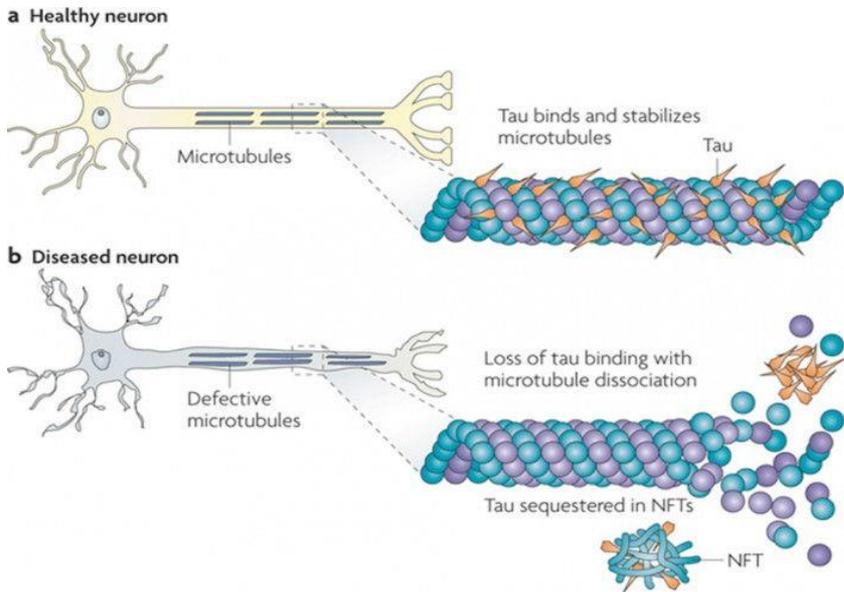
2. Modelli di Patologie: Alzheimer



Cause:

- 1. Ipofunzione colinergica → *Perdita della ChAT*
- 2. Errato taglio della APP → *Placche extracellulari di β -Amiloide*
- 3. Errata fosforilazione → *Grovigli neurofibrillari intracellulari*

proteina TAU

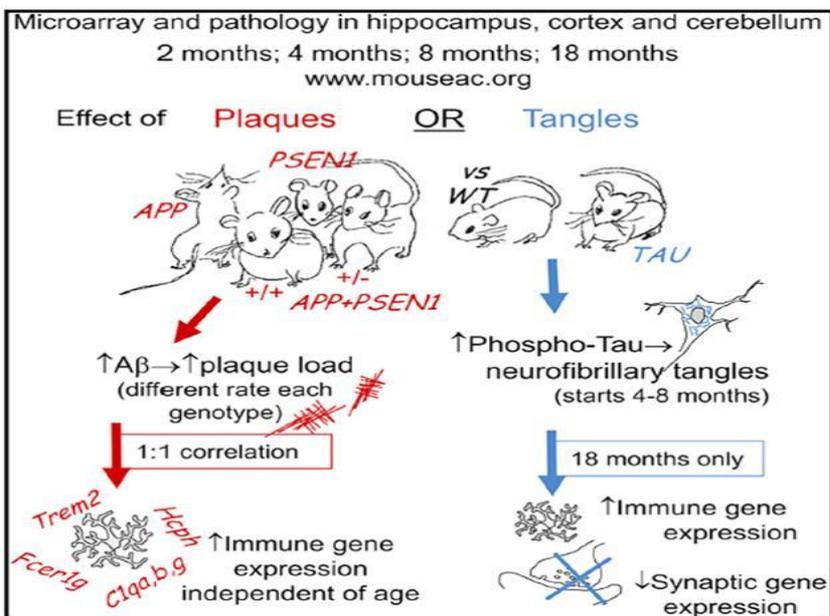
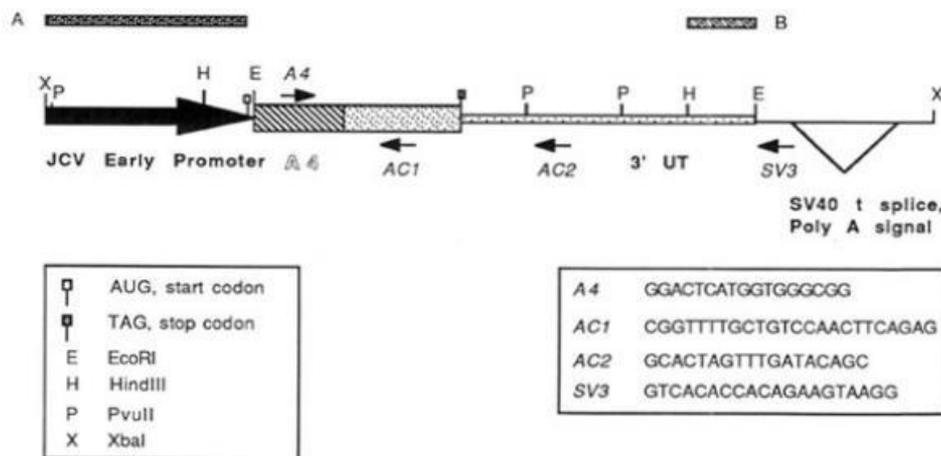


2. Modelli di Patologie: Alzheimer

MODELLI TRANSGENICI:

- **PDAPP:** sovraesprime la proteina umana APP
- **P301S:** transgenico TAU
- **Mutante doppio**
- **Mutante triplo**

Expression of β -Amyloid in Brains of Transgenic Mice



Studi su topi che **sovraesprimono** i geni per APP e PS1 hanno dimostrato che il mantenimento in un **ambiente arricchito** riduce la produzione di peptide tossico e la formazione delle placche senili



2. Modelli di Patologie: Parkinson



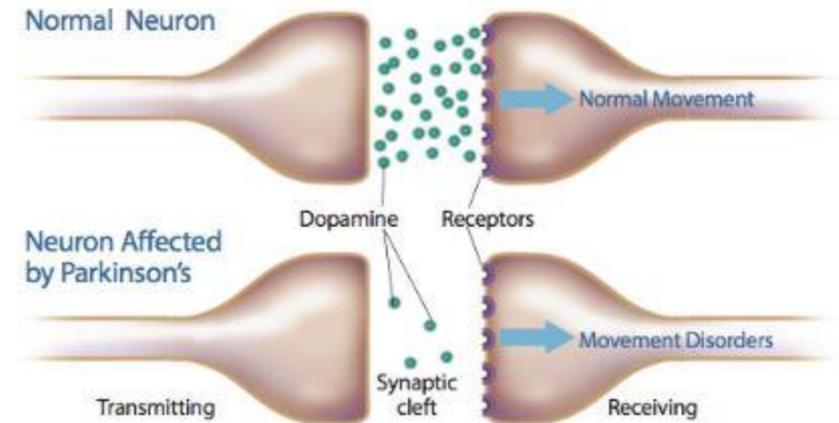
Parkinson: malattia **degenerativa** associata alla morte delle cellule neuronali coinvolte nella sintesi e rilascio di **dopamina**.
Può essere solo tratta con **metodi palliativi**

Geni coinvolti nella malattia: *circa 14*

Il **PARK1** è studiato attraverso modelli transgenici di topo.

Tale gene codifica per la proteina **alfa-sinucleina**

Mutazioni di tale gene codificano per una alfa-sinucleina **INSOLUBILE**



2. Modelli di Patologie: Parkinson



Modello per lo studio del gene **PARK1** tramite **topo** che presentava la mutazione del gene (**A53T**)



Rota-Rod Test: per studi di movimento, fondamentale per il Parkinson



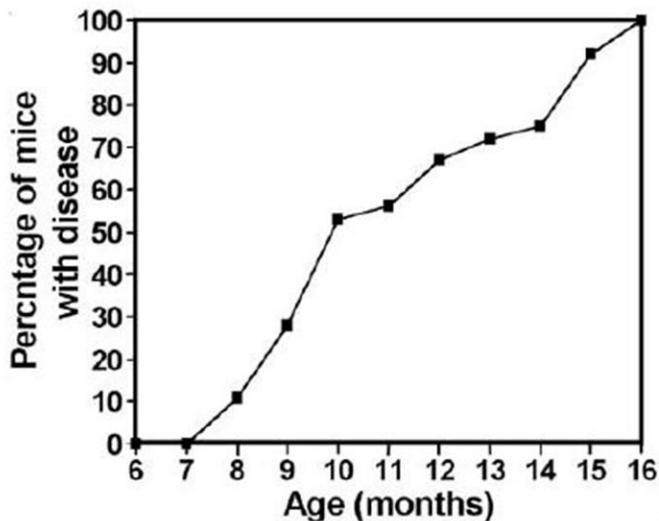
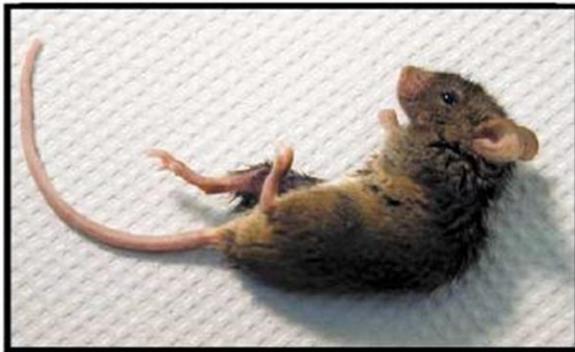
2. Modelli di Patologie: Parkinson



Il gene mutato è stato inserito per **microiniezione**.

I primi sintomi di **deficienza motoria** sono stati apprezzati a partire dall'ottavo mese di vita della prole creata

Il **modello** ha effettivamente dimostrato la presenza di aggregati di **alfa-sinucleina**, ma questi erano diversi da quelli riscontrati nell'essere umano (**corpi di Lewy**)



3. Xenotrapianti

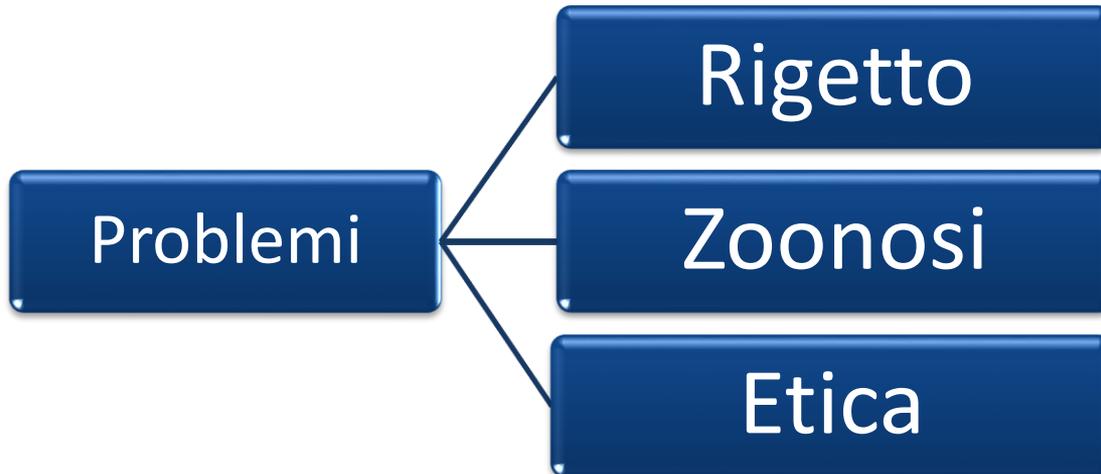


Xenotrapianto : “trapianto di organi, tessuti o cellule tra organismi di due specie diverse.”



Offre una promettente alternativa alla **poca disponibilità** di organi da trapiantare.

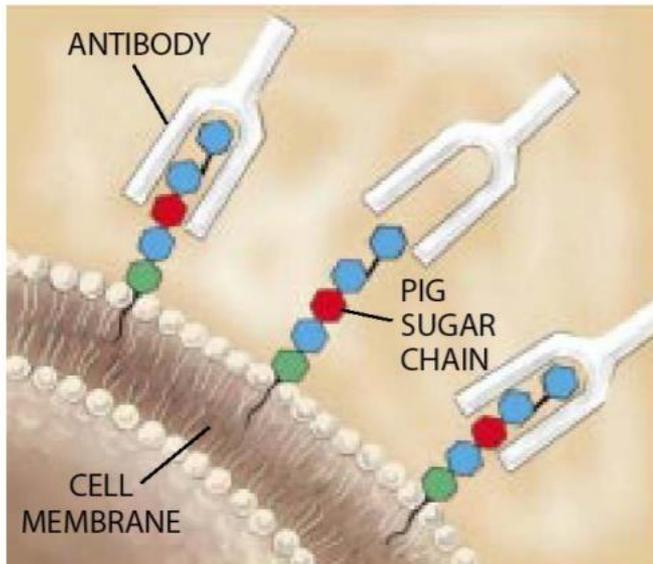
Suino: animale più adatto.



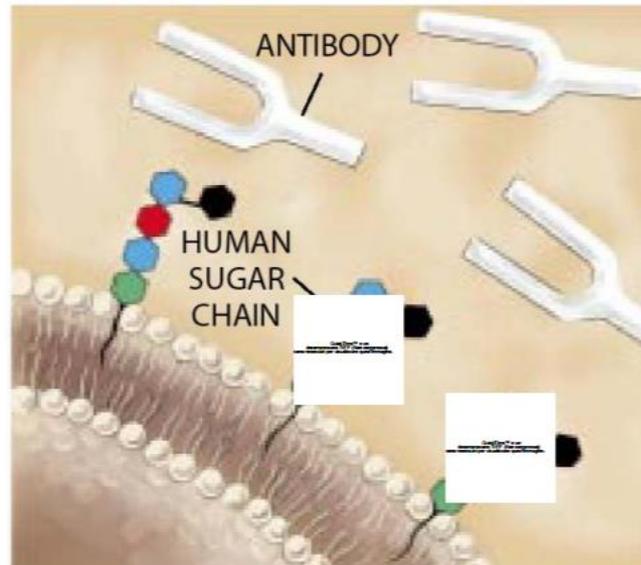
3. Xenotrapianti



**Il problema dei trapianti e' il rigetto:
Combattuta con Farmaci Immunosoppressori ma
Reazione Iperacuta e' difficile da controllare**



**Distruzione dei vasi sanguigni
Emorragia e morte dell'organo**



Cuore di maiale transgenico



Problema Etico



***Animali transgenici:** grande **potenzialità** per il progresso scientifico o **abominio** morale?*

Talidomide: disastro causato probabilmente da sottovalutazioni dell'importanza dei test clinici

Dario Fo



premio Nobel per la letteratura

*"Dario Fo dovrebbe visitare reparti dove ci sono persone in fin di vita che aspettano trapianti di fegato, di rene o di cuore per rendersi conto della **drammaticità del problema**"*



Conclusioni



"Noi umani siamo tutti transgenici. Se da scimmia siamo diventati uomo è per via di una serie di mutazioni spontanee.

*Come dice Jacques Monod, siamo un prodotto di natura emerso dall'intreccio di due variabili, il **caso** e la **necessità**. Il caso sono mutazioni genetiche non programmate, spontanee, sulle quali agisce la necessità, nel senso che un organismo mutato sopravvive solo se la mutazione lo rende adatto all'ambiente.*

*Le mutazioni genetiche, **molla dell'evoluzione**, sono prive di una normativa etica intrinseca, non hanno finalità. Con buona pace di chi vuole vedere nel mondo un disegno divino".*

(Umberto Veronesi)

